

Contagem automática de insetos em armadilhas adesivas – uma sugestão baseada no monitoramento de Sciaridae

Guilherme Schnell e Schühli¹

Infestações de insetos são causa de grandes perdas na produção agropecuária. O controle destas infestações é necessário para maximizar o potencial produtivo e manter a qualidade do produto. Ações de controle são baseadas no monitoramento constante da presença e da gravidade da infestação. Dependendo deste grau de infestação, as alternativas de controle e mitigação podem ser diferentes.

O monitoramento é tradicionalmente praticado com base em coletas manuais e armadilhas entomológicas, seguido da identificação taxonômica de um especialista. São diversos os tipos de armadilhas que podem ser utilizadas, dependendo do tipo de inseto a ser monitorado e das condições do espaço em questão. Tradicionalmente, as armadilhas adesivas são ferramentas eficientes para o monitoramento quantitativos de diversos tipos de insetos. Elas podem ser adquiridas em diferentes cores ou com associação de feromônios específicos para a atração dos insetos. São muito comuns, por exemplo, para o monitoramento e controle da

mosca-das-frutas (Diptera: Tephritidae) (MONTES; RAGA, 2006; SOUZA et al., 2008; GUAJARÁI et al., 2004).

No entanto, a contagem manual destas armadilhas pode ser muito trabalhosa, desperdiçando o tempo do técnico ou do cientista e, muitas vezes, comprometendo a agilidade na apresentação de laudos ou diagnósticos. Encontramos esta dificuldade no diagnóstico das infestações de moscas da família Sciaridae (Diptera), que tem ocorrido em grandes populações em pátios de armazenagem de toras de madeira (SCHUHLI et al., 2012). Tradicionalmente, estas moscas já eram conhecidas por infestar casas de vegetação, estufas de fungos, flores ornamentais e frutas silvestres. Vários podem ser os danos ocasionados por estes pequenos mosquitos. Em seu estágio jovem, eles podem transmitir diversos patógenos em vegetais, como *Pythium*, *Botrytis*, *Verticillium*, *Fusarium*, *Thielaviopsis*, *Cylindrocladium* e *Sclerotinia*. Podem também ocasionar dano físico pela alimentação das larvas. Este dano pode chegar a níveis que

¹Biólogo, Doutor, Pesquisador da Embrapa Florestas, guilherme.schuhli@embrapa.br

comprometem a viabilidade da muda (POWELL; LINDQUIST, 1996; PAIVA, 2004). Quando em grande número, os adultos destes insetos oferecem um incômodo sério, chegando a impedir o desenvolvimento das atividades corriqueiras dos trabalhadores no local e dos moradores do entorno. Estes insetos formam grandes massas, que são dispersas facilmente pelo vento, invadindo áreas de entorno e tornando insalubres os locais que infesta (SCHUHLLI et al., 2012).

Até o momento, as técnicas mais comuns de monitoramento e controle destes insetos são as armadilhas adesivas amarelas e a contagem de imaturos em discos de batata (HARRIS et al., 1995; SANTOS et al., 2012), que são avaliados por contagem visual.

Para aperfeiçoar a contagem destes insetos em armadilhas, levantamos opções de análise de imagens das armadilhas para a contagem automática. Partimos da experiência que tínhamos com o software ImageJ (SCHNEIDER et al., 2012). Trata-se de um programa desenvolvido em Java e de código de domínio público, com uma extensa variedade de aplicações científicas. O programa permite processos de edição, análise e processamento de imagens de diversas naturezas. Sua arquitetura Java aberta permitiu que diferentes programadores desenvolvessem *plugins* de extensão para fins específicos.

Por ser um programa de domínio público, ele estará sempre disponível de forma gratuita. Isto fomenta o desenvolvimento de novos *plugins* e manutenções das versões. O acesso livre à ferramenta nos levou a adotar a tecnologia, de forma que possa ser transferida para fins similares em atividades de monitoramento de pragas, por diferentes perfis de usuários, sem que o software represente um novo custo. Prevemos como usuários do método tanto produtores que queiram desenvolver o monitoramento, quanto prestadores de serviços ou pesquisadores que desejem adaptar a tecnologia para novas pesquisa ou no controle de pragas.

Uma das funções do programa é a análise de partículas, na qual é possível estabelecer parâmetros de contagem de objetos. A ferramenta é utilizada em processos de análise de materiais, como em nano partículas e na contagem de tipos celulares sanguíneos.

Para a entomologia florestal, a possibilidade de aplicação das ferramentas deste programa é inédita e pode ser de grande auxílio para diversos procedimentos. Em paralelo ao monitoramento de Sciaridae, atualmente estamos testando a contagem de Psílídeos em armadilhas amarelas adesivas e também para determinação de concentração de nematóides entomopatogênicos em soluções destinadas como doses para o controle de *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae). Desta forma, esta comunicação se propõe a apresentar os ajustes desta ferramenta do ImageJ para a contagem automática de insetos, esteja o material preso em armadilhas adesivas ou capturado em via líquida (em água, etanol ou qualquer outro líquido).

As condições a serem cumpridas para permitir a automatização da contagem são:

- a) A possibilidade de registro de todos os elementos a serem contabilizados em foco em uma única fotografia (o que pode ser conseguido a partir de múltiplas fotos de focalizações sequenciais).
- b) Que o elemento a ser contabilizado possa ser distinguido em classes de tamanho.

Este é o primeiro registro de aplicação desta ferramenta para contagem de armadilhas adesivas. Ele é importante para descrever a possibilidade de aplicação deste software para esta contagem específica, desonerando em muito a dedicação de técnicos e pesquisadores. Diversos insetos que demandam este controle podem ser verificados por meio desta tecnologia.

Notações para este comunicado

Para auxiliar na compreensão dos procedimentos com o programa ImageJ, é importante definir a forma como apontaremos as ações no programa.

Ações no menu serão indicadas em **negrito** e em inglês, pois a versão atual 1.47a ainda não dispõe de tradução para a língua portuguesa. Se houver mais de uma ação sequencial, notaremos através da barra da seguinte maneira: se demandarmos o comando “novo arquivo” este será assim indicado:

File/New

De tal forma que facilmente se distinga que o comando “New” está localizado no menu “File”.

Comandos disponíveis através de botões serão indicados pelo nome conforme seguinte orientação (Figura 1):

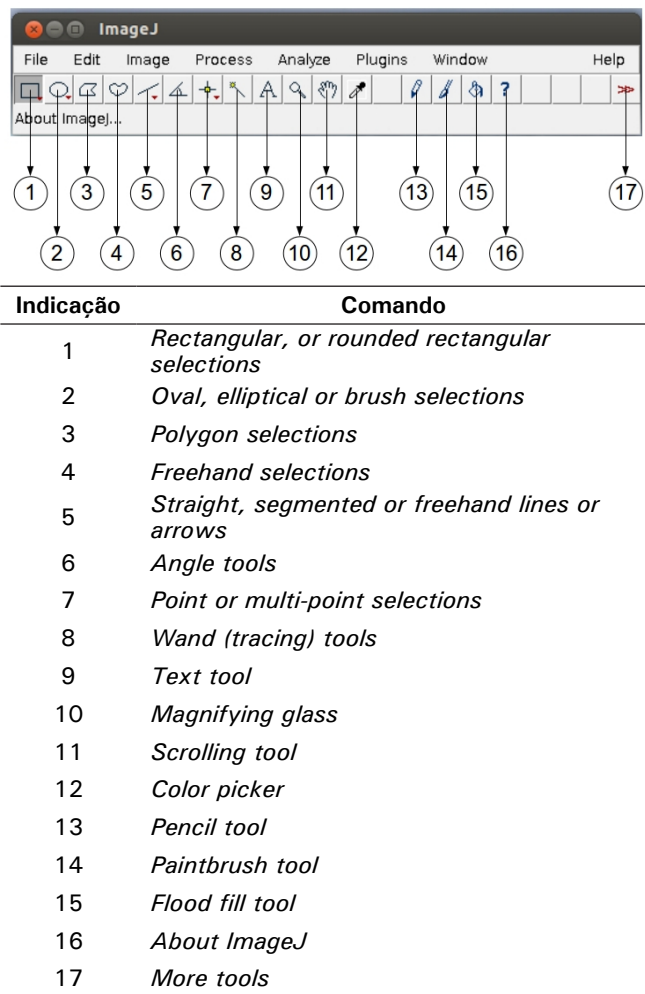


Figura 1. Figura com a barra de ferramenta do programa ImageJ, descrevendo abaixo as principais ferramentas e atribuindo um número de referência que será usado no texto para apontar as ferramentas.

Sugere-se que se proceda à validação antes de qualquer utilização deste método de contagem automática. Isto é feito mediante a comparação dos resultados de contagens automáticas e manuais. Cada objeto de estudo carece de uma avaliação cuidadosa para validar não o processo em si, mas os parâmetros utilizados nas condições peculiares de cada avaliação.

Obtenção do programa

O programa pode ser encontrado em diversos repositórios, sendo o principal o site do *Research Services Branch* (RSB) do *National Institute of Mental Health* (NIMH) e *National Institute of Mental Disorder and Stroke* (NIMDS) do governo dos Estados Unidos.

Página principal do <i>Research Services Branch</i> (RSB)	http://rsbweb.nih.gov/
Página principal do ImageJ	http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html
Página permanente da documentação (manual)	http://imagej.nih.gov/ij/docs/guide

Na página principal do ImageJ pode-se ter acesso a diversos documentos do programa, descrevendo suas implementações. Pode-se examinar e obter novos *plugins*, bem como ter acesso às listas de discussão e a ferramentas para desenvolvimento.

Instalação do programa

Além do código fonte para a compilação em cada sistema operacional (SO), a página principal do programa, na seção de “Downloads” dispõe também de executáveis específicos para a instalação do programa em cada SO, verificando a necessidade de atualização da versão e da plataforma Java (JRE). Atualmente, existem executáveis de auto-instalação para diversas versões de Windows, Mac OSX e Linux. Em Linux, ele também se encontra nos repositórios oficiais das maiores distribuições (Ubuntu, Open Suse e Fedora, por exemplo). Para instalação via *apt* em sistemas Debian, pode-se usar o comando “*sudo apt-get install imagej*” via terminal.

Página de downloads	http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html
---------------------	---

Metodologia para a contagem

1) Registro fotográfico

Para ilustrar o método, iremos expor a metodologia com base na armadilha adesiva amarela. O procedimento pode facilmente ser extrapolado para outros objetos de estudo, como, por exemplo, uma solução de nematóides ou de insetos coletados em etanol em armadilha luminosa. A viabilidade de extrapolação parte da possibilidade de um registro fotográfico, onde todos os objetos a serem contados possam estar no mesmo plano de focalização. No caso de soluções, isto pode ser facilmente conseguido vertendo-se o líquido sobre uma placa-de-petri ou equivalente. Outra possibilidade é a fusão de vários registros fotográficos em planos seriais para o processamento de uma imagem composta (*stacking*), onde todos os elementos em foco em

cada plano possam ser apresentados em uma foto final. Não iremos nos concentrar nesta alternativa, mas o ImageJ pode processar esta composição final a partir de uma série de fotos em diferentes níveis de focalização com o uso do *stack focuser plugin* (disponível em: <http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/stack-focuser.html>).

É importante que a armadilha esteja esticada em superfície plana para permitir o registro fotográfico de todos os espécimes capturados em foco. Para isto, usamos uma plataforma ou tripé onde fixamos a armadilha e a câmera para o processamento da imagem. Câmeras que permitam resolução maior que 3 megapixels foram suficientes para permitir a distinção de insetos de dimensões relativas aos Sciaridae de nosso interesse. Os micro-diptera desta família apresentam de 1-7 mm de comprimento (MENZEL et al., 2003). É comum que, ao se resgatar a armadilha em campo, esta seja protegida em plástico ou outra superfície protetora. Se esta proteção não oferecer maiores distorções de reflexão, a documentação e contagem ainda é possível. Uma boa iluminação pode melhorar a captura de imagens sem reflexões.

Se as dimensões da armadilha são conhecidas e fixas não é necessário fazer uso de indicação de escala. Mas, se existe variação, é importante que se inclua um elemento de escala na foto. Isto pode ser feito de diferentes maneiras, desde que seja possível relacionar um objeto à correta dimensão. Pode, por exemplo, ser feito recortando-se uma fita adesiva em um pequeno retângulo a ser colado próximo ou sobre a armadilha (desde que, obviamente, não cubra nenhum material a ser contabilizado).

2) Transformação da imagem

Excute o programa ImageJ e carregue a imagem fotografada da armadilha com o comando “Open” do menu “File”(Figura 2).

File/Open

Com a ferramenta de seleção retangular [1] delimite a área a ser examinada. No menu “Image” selecione o comando “Crop” (Figuras 3 e 4).

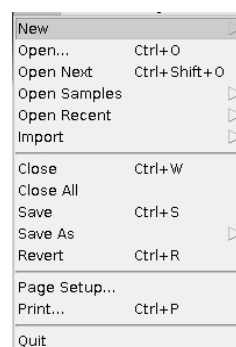


Figura 2. Opções de submenus e comandos do menu “File”.

Image/Crop



Figura 3. Comandos e submenus do menu “Image”.

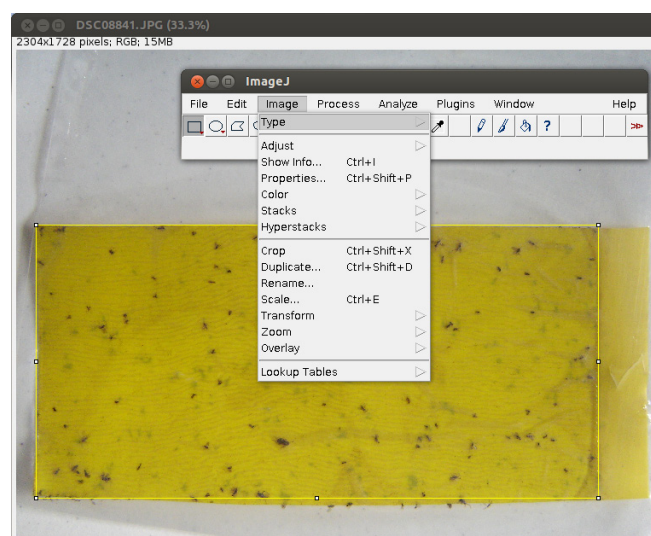


Figura 4. Imagem da armadilha carregada no programa, seleção através da ferramenta retangular e menu “Image”.

3) Atribuindo escala

Com a ferramenta de linha [5], trace uma linha que tenha equivalência com uma das medidas conhecidas. Por exemplo, na figura 5 foi traçada a linha na largura da armadilha que tinha um comprimento conhecido de 11 cm. No menu “Analyze” acione o comando “Set Scale” para o diálogo de relação entre medida entre pixels do objeto traçado e medida conhecida.

Analyze/Set Scale

Na janela de diálogo resultante do comando “Set Scale” pode-se estabelecer o valor conhecido no item “known distance” (distância conhecida), bem como a “Unit of length” (unidade de comprimento). Esta relação estabelecerá uma escala para o trabalho (Figura 6).

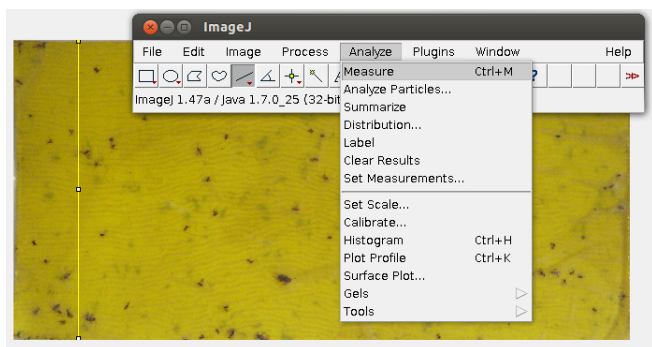


Figura 5. Ferramenta de linha desenhando uma dimensão previamente conhecida (largura) para atribuição de escala e menu “Analyze”.

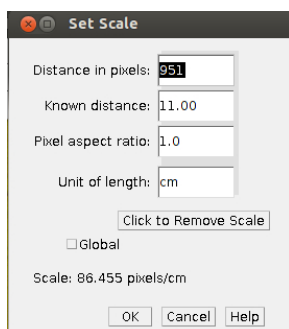


Figura 6. Janela de diálogo do comando “Set Scale” para referência de escala.

4) Decompondo a imagem

Para aperfeiçoar a contagem, duas alterações são oportunas para reduzir a imagem original em formatos que ofereçam a descrição de cada pixel, ou seja, em formato *raster* ou *bitmap*. A primeira transformação é a de suprimir as cores em tons de cinza. Isto pode ser feito com o comando de “8 bits”, disponível no submenu “Type”, do menu “Image” (Figura 7).

Image/Type/8 bits

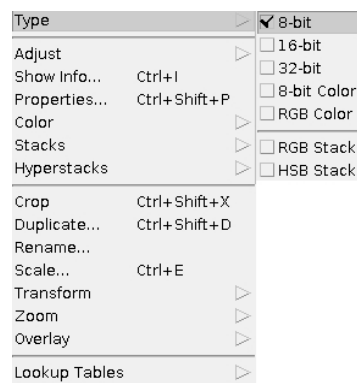


Figura 7. Menu “Image” e submenu “Type” indicando o comando 8-bit para a transformação da imagem em formato de 8 bits.

Depois, é necessário reduzir o limiar ou a tolerância da imagem, no intuito de somente considerar as bordas dos insetos e não artefatos originados de eventual sujeira ou distorções de luz na captura da imagem. Isto pode ser feito de diferentes maneiras e aperfeiçoado para cada situação. Sugerimos utilizar o comando “Treshold”, do submenu “Adjust”, do menu “Image”. Este comando invoca uma janela de diálogo onde se pode estabelecer os níveis de tolerância de imagem para que se contabilize somente as bordas dos insetos. Isto transformará a imagem em tons de branco e preto absoluto, o que permitirá ao programa reconhecer as bordas ou limite de cada objeto a ser contado (Figura 8).

Image/Adjust/Treshold

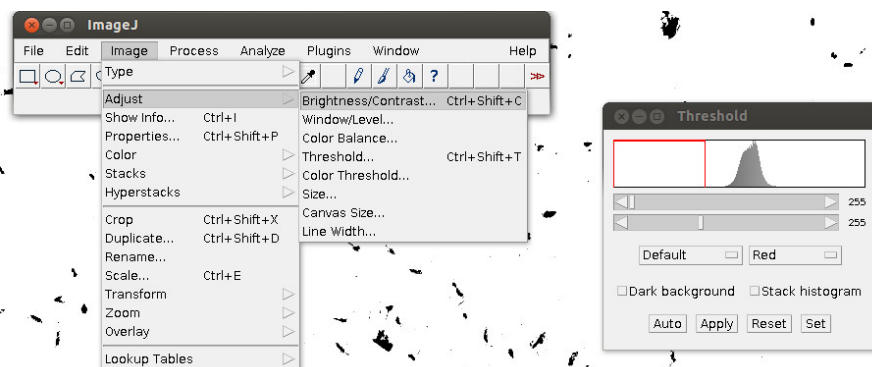


Figura 8. Menu “Image”, submenu “Adjust” e janela de diálogo com parâmetros do comando “Treshold”, onde pode-se estabelecer os níveis de tolerância de imagem.

5) Executando a contagem

Depois de decomposta em formato *raster*, a contagem de insetos pode ser feita a partir do comando “Analyze particles”, do menu “Analyze”.

Analyze/ Analyze particles

Este comando invocará uma janela de diálogo onde é possível estabelecer diversas opções de contagem e resultados (Figura 9). Se a escala foi estabelecida no passo 3, o diálogo apresentará uma faixa de seleção de área (cm², por exemplo) para a contagem. Esta alternativa permite manter a contagem em uma faixa de tamanho, excluindo eventuais insetos que não sejam interesse da observação. Em nosso caso, capturas de Tachinidae, Muscidae e Tipulidae são excluídas da contagem por meio desta ferramenta. Pode-se também atribuir um grau de circularidade para considerar as medidas. Este grau varia de 0 (completamente linear) a 1 (completamente circular). É possível solicitar ao programa que apresente uma figura com as linhas de contorno dos objetos considerados ou ainda elipses, máscaras (sobre a figura original) e outras opções, para verificar a eficiência dos parâmetros selecionados para a contagem na caixa de seleção “Show” deste menu (Figura 10). Opções de resultado podem ser marcadas para solicitar resumo da contagem (“Summarize”) ou descrição de cada item contabilizado (“Display results”) (Figura 11). O resumo dos resultados lista as características das amostras contabilizadas e pode ser utilizado para validar os parâmetros utilizados (por exemplo, verificando a variação de área para cada objeto, o que pode indicar heterogeneidade entre as amostras). Tanto a janela de Sumário (“Summary”) quanto a de resultados (“Results”) pode ser exportada em formato de extensão para programas de planilhas (*.xls), permitindo diversas opções de análises estatísticas sobre os dados.

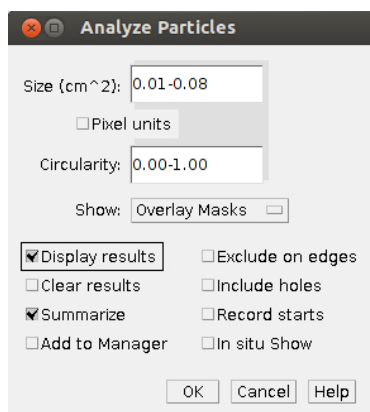


Figura 9. Janela de diálogo com os parâmetros do comando “Analyze particles” do menu “Analyze”, onde é possível estabelecer diversas opções de contagem e resultados.

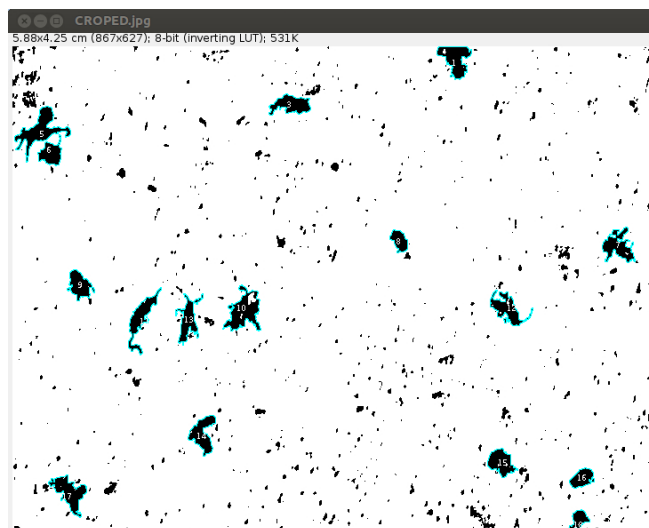


Figura 10. Resultado da contagem expresso em máscara de sobreposição (“Overlay Masks”) sobre a imagem original. Pode-se notar os números atribuídos a cada objeto. Note que objetos fora da faixa de tamanho apontada foram ignorados na contagem.

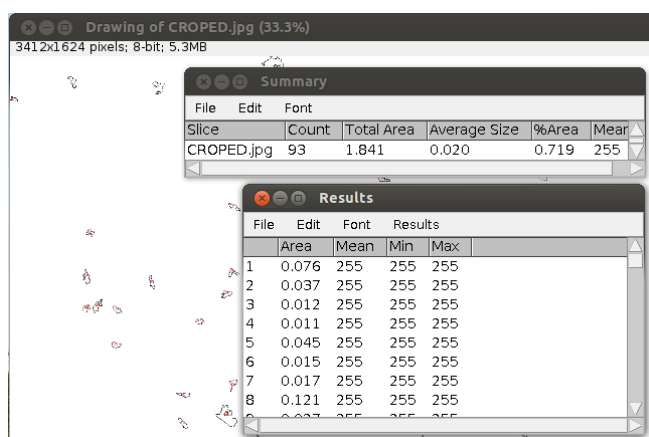


Figura 11. Janelas de sumário (“Summary”) e de resultados (“Results”), ambas resultantes opcionais do comando “Analyze Particles”. Em “Summary”, pode-se obter o número total da contagem, e em “Results”, os detalhes de medidas de cada partícula contada.

6) Refinamentos da imagem

Em determinadas condições, as armadilhas podem conter muita sujeira ou problemas no registro da imagem (por exemplo, o plástico usado para recobrir a armadilha ficou muito dobrado, causando chanfras e/ou reflexões). Uma alternativa para tentar filtrar estes artefatos pode ser o ajuste de brilho ou contraste ou níveis conforme os comandos abaixo, antes do ajuste de tolerância.

Image/Adjust/Brightness Contrast

Image/Adjust/Window level

Quando houver itens a serem computados em sobreposição, é viável utilizar o comando “Watershed”, no submenu “Binary”, do menu “Process”.

Process/Binary/Watershed

Esta opção deve ser utilizada com parcimônia, pois, como os insetos a serem processados não obedecem a um contorno circular homogêneo, isto pode resultar em divisão da área de asas do corpo do inseto e contabilidade enviesada. Porém, para a contagem de ovos, larvas e outros elementos pode ser uma ferramenta importante para a distinção de elementos sobrepostos.

Referências

- GUAJARA, M., CARVALHO A. G. de; SANTOS, W.; GONÇALVES, K. Resposta de *Euphalerus clitoriae* (Hemiptera: Psyllidae) a armadilhas adesivas de diferentes cores. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 28, n. 1, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622004000100015>.
- HARRIS, M. A.; OETTING, R. D.; GARDNER, W. A. Use of Entomopathogenic Nematodes and a new monitoring technique for control of fungus gnats, *Bradysia coprophila* (Diptera: Sciaridae), in Floriculture. **Biological Control**, Orlando, v. 5, n. 3, p. 412-418, 1995. DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/bcon.1995.1049>.
- MENZEL, F.; SMITH, J. E.; COLAUTO, N. B. *Bradysia difformis* Frey and *Bradysia ocellaris* (Comstock): two additional neotropical species of black fungus gnats (Diptera: Sciaridae) of economic importance: a redescription and review. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 96, n. 4, p. 448-457, 2003.
- MONTES, S. M. N. M.; RAGA, A. Eficácia de atrativos para monitoramento de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) em pomar de citros. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 3, p. 317-323, 2006.
- PAIVA, P. E. B. Moscas-dos-fungos: praga potencial de mudas cítricas em São Paulo. **Citricultura Atual**, Cordeirópolis, v. 8, p. 18-19, 2004.
- POWELL, C. C.; LINDQUIST, R. K. **Ball pest & disease**. Batavia: Ball Publishing, 1996. 426 p.
- SANTOS, A.; ZANETTI, R.; ALMADO, R. P.; SERRÃO, J. E.; ZANUNCIO, J. C. First report and population changes of *Bradysia difformis* (Diptera: Sciaridae) on eucalyptus nurseries in Brazil. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 95, n. 3, p. 569-572, 2012.
- SCHNEIDER, C. A., RASBAND, W. S., ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, New York, v. 9, p. 671-675, 2012.
- SCHUHLLI, G. S. e; PENTEADO, S. do R. C.; REIS FILHO, W.; IEDE, E. T. Fungus gnats as nuisance factor in Pinus timber yards. In: CONGRESSO FLORESTAL PARANAENSE, 4., 2012, Curitiba. **Anais**. [Curitiba]: Malinovski Florestal, 2012.
- SOUZA, J. F. de; SOUZA, S. A. da S.; AGUIAR-MENEZES, E. de L.; FERRARA, F. A. A.; NASCIMENTO, S. A.; RODRIGUES, W. C.; CASSINO, P. C. R. Diversidade de moscas-das-frutas em pomares de citros no município de Araruama, RJ. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 38, n. 2, p. 518-521, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000200035>.

Comunicado Técnico, 330

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Florestas
Endereço: Estrada da Ribeira Km 111, CP 319
Fone / Fax: (0**) 41 3675-5600
E-mail: cnpf.sac@embrapa.br

1ª edição
 Versão eletrônica (2013)



Comitê de Publicações

Presidente: Patrícia Póvoa de Mattos
Secretária-Executiva: Elisabete Marques Oaida
Membros: Alvaro Figueredo dos Santos, Cláudia Maria Branco de Freitas Maia, Elenice Fritzsons, Guilherme Schnell e Schuhli, Jorge Ribaski, Luis Claudio Maranhão Froufe, Maria Izabel Radomski, Susete do Rocio Chiarello Penteado

Expediente

Supervisão editorial: Patrícia Póvoa de Mattos
Revisão de texto: Patrícia Póvoa de Mattos
Normalização bibliográfica: Francisca Rasche
Editoração eletrônica: Rafaela Crisostomo Pereira